

## PENGARUH INDUKSI *EPIDERMAL GROWTH FACTOR* (EGF) TERHADAP PROTEIN Cx43 SELAMA EKSPANSI SEL KUMULUS

### *Induction Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) Against Cx43 Protein During the Cumulus Cell Expansion*

Chomsa Dintasari Umi Baszary<sup>1</sup>, Sutiman Bambang Sumitro<sup>2</sup>, Mochammad Sasmito Djati<sup>2</sup>,  
dan Edi Widjajanto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pattimura, Ambon

<sup>2</sup>Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: chomsa\_dub@yahoo.com

#### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh induksi EGF terhadap lokalisasi Cx43 dan gap junction selama ekspansi sel kumulus. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspansi sel kumulus mempunyai signifikansi dengan meningkatnya konsentrasi EGF dan waktu kultur. Ekspansi sel kumulus diindikasikan dengan perubahan bentuk sel menjadi memanjang dan menyebar. Ekspresi Cx43 meningkat pada kultur jam ke-5 dan semakin meningkat pada kultur jam ke-10 dengan semakin padatnya protein pada badan sel. Pada kultur jam ke-15 terjadi penurunan ekspresi Cx43 pada badan sel. EGF berpengaruh terhadap peningkatan ekspansi sel kumulus tetapi tidak pada ekspresi Cx43 dengan bertambahnya konsentrasi dan waktu kultur. Hal ini menunjukkan bahwa komunikasi antar sel kumulus menurun, karena jarak antar sel yang semakin jauh.

Kata kunci: EGF, Cx43, kumulus

#### ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the influence of epidermal growth factor (EGF) induction to Cx43 localization and gap junction during cumulus cell expansion. The results of this study showed that cumulus cell expansion was related to the higher concentration of EGF and time of cumulus cell cultures. Cumulus cell expansion in vitro was indicated by changes in cell shape from round to elongate and spreading of the cell. The expression of Cx43 was increased in the 5th hour of culture and gradually increased to the 10<sup>th</sup> hour of culture along with the denser of protein in the cell. At the 15<sup>th</sup> hour of culture Cx43 expression was decreased on the cell. It can be concluded that higher concentration and time of culture influence EGF role on the increase of cumulus cell expansion but not on Cx43 expression. This proved that the communication between cumulus cells was reduced since the space between the cells was distant.

Key words: EGF, Cx43, cumulus

#### PENDAHULUAN

Data infertilitas wanita di Indonesia sebesar 45% dengan masalah pada oviduk (40%), ovulasi (15-25%), periterium/endometriosis (25%), serviks (5%), uterus (5%) dan sisanya sebesar 10-15% merupakan faktor-faktor yang tidak dapat dijelaskan (idiopatik) (BKKBNTB, 2009). Kejadian infertilitas idiopatik dapat disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah peran lingkungan mikro-oosit yang mendukung pertumbuhan dan proses maturasi oosit. Folikel ovarium sebagai lingkungan mikro dan sumber sinyal merupakan mediasi utama melalui sel granulosa dan sel kumulus yang bertanggung jawab untuk memelihara pertumbuhan dan perkembangan oosit (Thomas *et al.*, 2004 yang disitasi Gilchrist *et al.*, 2008).

Sel kumulus berperan selama pertumbuhan dan maturasi oosit (Gilchrist *et al.*, 2008) yang ditunjukkan dengan signifikansi antara tingkat ekspansi sel kumulus dengan kualitas maturasi oosit (Widjati, 2007). Sel kumulus merupakan mediator penyedia transpor energi (Sutton *et al.*, 2003), mikronutrisi, dan atau molekul pembawa untuk perkembangan oosit (Buccione *et al.*, 1990; Cecconi *et al.*, 2008) dan menjadi mediasi

pengaruh hormon pada kompleks kumulus-oosit (Suzuki *et al.*, 2000).

Sebagai mediator transpor, sel kumulus berperan penting dalam maturasi oosit secara *in vitro* dan perkembangan berikutnya melalui *gap junction communication* (GJC) (Mori *et al.*, 2000). *Up regulation* dari GJC memiliki asosiasi dengan peningkatan cAMP dan fosforilasi Cx43 (Lau *et al.*, 1992). Mediasi komunikasi oleh Cx43, ukuran dan jumlah *gap junction* dapat ditingkatkan oleh agen yang meningkatkan cAMP intraseluler (TenBroek *et al.*, 2001).

Inisiasi permulaan meiosis berasosiasi dengan terjadinya reduksi protein Cx45 (Marchal *et al.*, 2003) dan *gap junction* (GJ) tetap ada di antara sel kumulus dan oosit sampai setelah terjadinya *germinal vesicle break down* (GVBD) (Webb *et al.*, 2002). Satu mekanisme yang dapat menjelaskan perpindahan sinyal penghambat dari folikuler untuk merusak *gap junction* adalah dengan menghalangi aliran beberapa sinyal inhibitor dari sel folikuler menuju oosit. Sinyal alami untuk menjelaskan hal tersebut belum diketahui (Webb *et al.*, 2002).

Secara langsung Cx43 berikatan dengan  $\alpha$  dan  $\beta$ -tubulin dan mikrotubul terdapat pada perifer sel

bersama dengan protein penyusun *gap junction* yaitu Cx43 (Giepmans, 2004). Penyusunan kembali Cx43 sangat cepat dan pergerakannya sering kali memerlukan interaksi dengan elemen sitoskeleton yaitu filamen aktin dan mikrotubul yang berasosiasi dengan membran plasma (Guo *et al.*, 2003).

## MATERI DAN METODE

### Aspirasi dan Koleksi Sel Kumulus

Oosit dan sel kumulus diaspirasi dari ovarium yang disimpan dalam NaCl fisiologis dan diberi tambahan penisilin-G (0,006 g/100 ml) dan streptomisin sulfat (0,01 g/100 ml) pada suhu 30-35° C. Aspirasi dilakukan dengan menggunakan jarum ukuran 20 G yang dihubungkan dengan spuit 5 ml berisi 1 ml medium *washing* 0% serum. Selanjutnya sel kumulus dicuci dengan cara disentrifugasi (1500 rpm selama lima menit) sebanyak tiga kali berturut-turut dengan medium *washing* 0, 5, dan 10% serum.

### Pemaparan EGF terhadap Ekspansi Sel Kumulus

Media kultur TCM-199 10% (9 ml TCM+1 ml FBS) disiapkan dan disaring dengan *holder*. Media diteteskan pada gelas objek yang diletakkan di dasar cawan petri berisi 2,5 cc media kultur dan ditutup dengan *mineral oil*. Kultur diinkubasi dengan suhu 38° C dan 5% CO<sub>2</sub>. Perlakuan EGF menggunakan dosis 0, 50, 100, dan 200 ng/ml. Pengamatan terhadap tingkat ekspansi sel kumulus dilakukan pada jam ke-0, 5, 10, 15, dan 20 dengan parameter pengamatan terhadap tingkat ekspansi sel kumulus.

### Preparasi Sel Kumulus

*Culture disc* 24 *well* yang berisi *coverslip* dan media kultur TCM-199 10% (9 ml TCM + 1 ml serum) disiapkan, kemudian ditambahkan EGF 0, 50, 100, dan 200 ng/ml dan disaring dengan *holder*. Medium kultur sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam *culture disc* 24 *well*. Selanjutnya sel kumulus dimasukkan ke dalam *well* tepat di atas *coverslip*, dan diinkubasi dengan suhu 38° C, 5% CO<sub>2</sub> sampai jam kultur ke-0, 5, 10, 15, dan 20.

Pada masing-masing serial jam dilakukan fiksasi. Kelompok sel kumulus difiksasi dalam 2,5% paraformaldehid (w/v) dalam PBS pH 7,3. Selanjutnya

diinkubasi dalam larutan 50 mM amonium klorida, dicuci, dan diawetkan dalam 0,1 M PBS yang berisi 0,05% *sodium azide* (NaN<sub>3</sub>) dan 1 mM PMSF (Sutovsky *et al.*, 1993).

### Immunohistokimia Lokalisasi Cx43

*Indirect immunofluorescence* menggunakan antibodi poliklonal anti-Cx43 yang diencerkan dalam 1:350 PBS digunakan sebagai antibodi primer dan FITC *conjugate anti-mouse* IgG diencerkan dalam 1:300 PBS sebagai antibodi sekunder. Untuk menghalangi reaksi non spesifik dilakukan preinkubasi dalam 0,1 M PBS yang berisi 2% BSA; 0,05% NaN<sub>3</sub>; dan 0,05% saponin (Sigma). Inkubasi selama satu jam dengan antibodi primer dan dicuci dengan 0,1 M PBS yang berisi 2% BSA; 0,05% NaN<sub>3</sub>; dan 0,05% *Tween-20* dan diperlakukan dengan antibodi sekunder FITC *conjugate anti-Rat* IgG selama satu jam dan dicuci kembali dengan 0,1 M PBS yang berisi 2% BSA; 0,05% NaN<sub>3</sub>; dan 0,05% *Tween-20*. (Sutovsky *et al.*, 1993; Luciano *et al.*, 2004). Sel kumulus diamati dengan *confocal laser scanning microscope* (Luciano *et al.*, 2004).

### Analisis Data

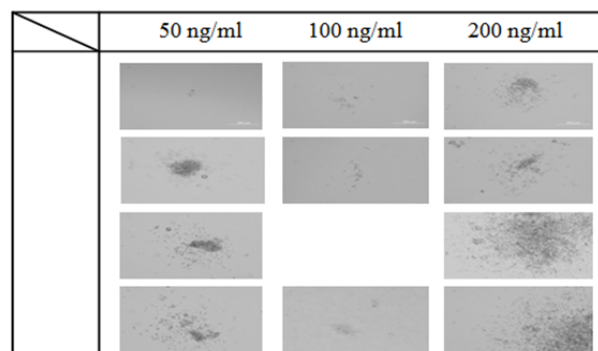
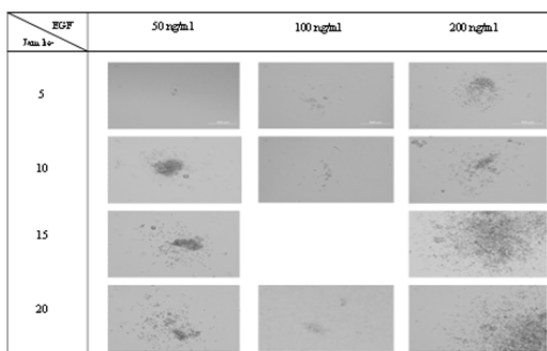
Analisis data dilakukan secara deskriptif terhadap ekspansi sel kumulus dan protein Cx43 dan *gap junction*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekspansi Sel Kumulus

Bertambahnya konsentrasi EGF dan waktu kultur pada perlakuan, memberikan pengaruh yang signifikan terhadap ekspansi sel kumulus (Gambar 1).

Pada Gambar 1 terlihat perkembangan ekspansi sel kumulus yang signifikan, semakin tinggi konsentrasi EGF dan waktu kultur sel kumulus menunjukkan ekspansi yang lebih cepat. Ekspansi sel kumulus secara *in vitro* ditunjukkan dengan perubahan bentuk sel dari bentuk bulat menjadi memanjang dan menyebar. Hal ini menjelaskan salah satu peran EGF pada perkembangan sel, induksi EGF dapat menyebabkan reorganisasi sitoskeleton, pembentukan lamelipodia, dan perubahan morfologi sel (Yang *et al.*, 2004; Kharchenko *et al.*, 2007).



**Gambar 1.** Serial waktu ekspansi sel kumulus dengan perlakuan EGF

Reorganisasi sitoskeleton oleh stimulus EGF terjadi melalui jalur sitoplasmik yang menghasilkan reorganisasi F-actin, dan jalur translokasi nukleus menghasilkan ekspresi gen seperti penyusunan dan reorganisasi di dalam dinamik mikrotubul yang berkaitan dengan aktivitas protein STAT5B melalui JAK/STAT kinase.

Jalur JAK/STAT diinisiasi oleh induksi sinyal dari EGF yang terlibat di dalam respons untuk *survival* sel (Kisseleva *et al.*, 2002; Henson dan Gibson, 2006 yang disitasi Hooper, 2012). JAK memfosforilasi protein STAT pada membran plasma yang dilanjutkan dengan translokasi protein STAT menuju nukleus dan mengaktivasi transkripsi gen yang berasosiasi dengan *survival* sel (Gambar 2) (Hooper, 2012).

Aktivasi STAT menghasilkan aktivitas transkripsi berbagai ekspresi gen melalui fosforilasi *tyrosine*-JAK. Aktivasi protein STAT dikatalisis oleh reseptor permukaan sel yang berasosiasi dengan tirosin kinase sehingga STAT membentuk *homodimer* (STAT3-STAT3) atau *heterodimer* (STAT3-STAT5) untuk dapat bertranslokasi ke dalam nukleus (Kabotyanski dan Rosen, 2003). Di dalam nukleus, *dimer* berikatan dengan rangkaian spesifik yang disebut GAS dalam *promoter region* sel target dan mulai menstimulasi terjadinya transkripsi gen (Paukku, 2003; Henninghausen dan Robinson, 2008). Diduga ikatan antara STAT5A dan STAT5B dengan DNA yang diinduksi oleh Prl dan Src menuju *GAS-like sequences* (seperti  $\beta$ -casein) aktivasi STAT5A dengan GAS dalam bentuk *tetramer* sementara STAT5B dalam bentuk *dimer* (Kabotyanski dan Rosen, 2003). Protein STAT5A dan STAT5b memberikan kontribusi yang berbeda terhadap ekspresi gen target dan hanya sedikit gen yang diketahui diregulasi oleh STAT antara lain  $\beta$ -casein, Cis, OSM, dan Bcl-x (Gesbert dan Griffin, 2000).

Kultur EGF menginduksi fosforilasi tirosin dari STAT5B yang berkorelasi dengan aktivitas spesifik DNA-binding, dan juga residu tirosin yang lain (Guren *et al.*, 2003). Pada fibroblas tikus sinyal yang diregulasi oleh EGF dan c-Src mendapat kontribusi dari STAT5B.

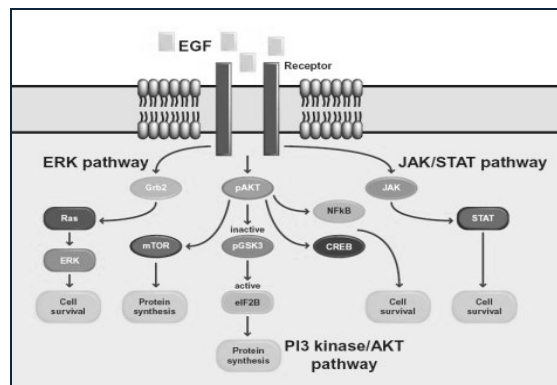
Aktivasi EGF terhadap beberapa STAT pada hati, berimplikasi pada regulasi proliferasi sel. Pada isolasi sel hepatosit, EGF mengaktivasi STAT1, STAT3, dan khususnya STAT5B. Kemampuan EGF untuk menghasilkan aktivasi dengan cepat dilemahkan ketika sel berada dalam kultur, sementara aktivasi oleh IFN-gamma (STAT1) dan IL-6 (STAT3) tetap berlangsung. Kultur hepatosit pada 24-48 jam mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap pengaruh EGF pada fase-S dalam siklus sel. Kemampuan EGF untuk mengaktivasi beberapa protein STAT tidak sama pada setiap bagian dari mekanisme mitotik yang digunakan oleh EGFR pada hepatosit (Guren *et al.*, 1999).

### Ekspresi Protein Connexin 43

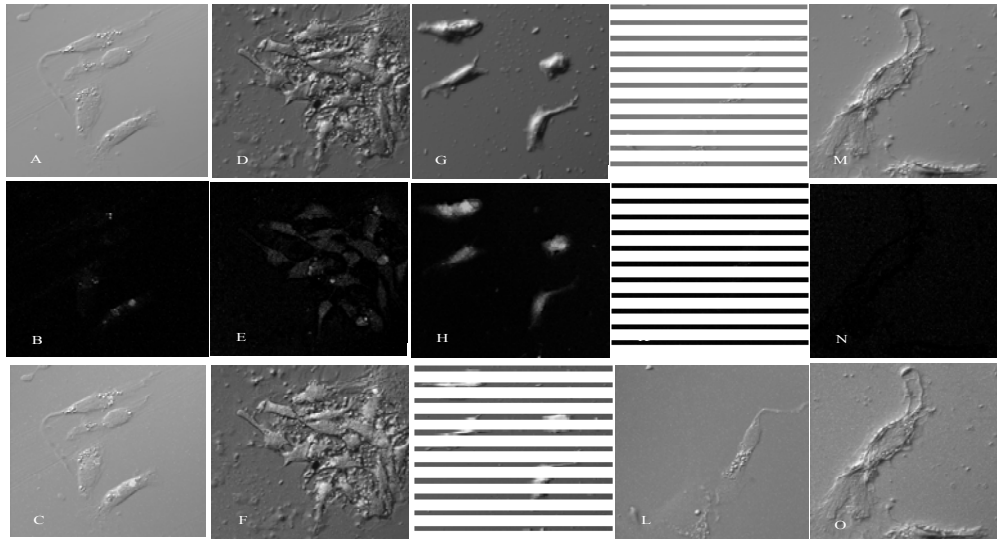
Hasil perlakuan EGF terhadap ekspresi protein *gap junction* connexin 43 dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada Gambar 3 menunjukkan ekspresi protein Cx43 pada jam ke-0, 5, 10, 15, dan 20 yang menunjukkan peningkatan dan penurunan ekspresi Cx43 seiring dengan lamanya kultur. Peningkatan ekspresi Cx43 terlihat pada jam kultur ke-5, Cx43 terlihat memenuhi seluruh badan sel kumulus. Sebelumnya pada jam ke-0, Cx43 terekspresi hanya pada sebagian badan sel. Memasuki kultur jam ke-10, ekspresi Cx43 terlihat dengan jelas ekspresi yang lebih padat pada badan sel dibandingkan dengan jam ke-5. Memasuki kultur jam ke-15 terlihat penurunan ekspresi Cx43 di seluruh badan sel dan semakin mengalami penurunan pada jam ke-20.

Eksansi sel kumulus dapat terjadi karena pengaruh perlakuan EGF yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel. Selain itu EGF dapat menginduksi fosforilasi Cx43 residu *serine255* (Ser255). Aktivasi EGF dimulai ketika berikatan dengan EGFR yang secara cepat menstimulasi peningkatan fosforilasi Cx43 pada Ser255, Ser279, dan Ser282. Aktivasi ini dimulai dengan aktivasi ERK1/2 melalui *growth factor receptor-bound protein-2* (GRB2) yang selanjutnya secara berantai mengaktivasi *son of sevenless* (SOS), Ras, Raf1, MEK1/2, dan terakhir memfosforilasi residu *serine*. Selanjutnya Cx43 berfungsi secara selektif



**Gambar 2.** Pathway signaling EGF. Aktivasi reseptor EGF dihasilkan melalui autofosforilasi yang merupakan kunci residu tirosin. (Tirosin memfosforilasi bagian dari protein untuk berikatan dengan domain SH2 dan menyebabkan aktivasi *downstream signaling* meliputi RAS/extracellular signal regulated kinase (ERK), PI3, dan JAK/STAT. Jalur-jalur ini berkoordinasi untuk *survival* sel (Hooper, 2012).



**Gambar 3.** Pengaruh EGF terhadap ekspresi protein Cx43. ((A,B,C) perlakuan pada jam ke-0, (D,E,F) ke-5, (G,H,I) ke-10, (J,K,L) ke-15, dan (M,N,O) ke-20. Baris ke-1 dengan pencahayaan DIC; baris ke-2 dengan pencahayaan FITC; baris ke-3 dengan pencahayaan DIC-FITC).

memberikan jalan pada molekul spesifik permeabel seperti  $2^{nd}$  messenger menuju cAMP dan cGMP. Selanjutnya mengaktifasi Ras-Raf-MEK dan memfosforilasi ERK menuju ke dalam nukleus. Kaskade ERK secara dependen memfosforilasi Sp1 dan memediasi aktivasi transkripsional melalui *connexin response element* (CxRE) dan mendereregulasi sinyal anti-apoptosis (Cameron *et al.*, 2003).

Perlakuan induksi EGF terhadap kultur sel kumulus menunjukkan adanya peningkatan perkembangan ekspansi sel, tetapi pada ekspresi Cx43 menunjukkan terjadinya peningkatan pada kultur jam ke-5 dan terjadi penurunan pada jam ke-15. Hal ini menjelaskan bahwa protein Cx43 mulai terdegradasi pada saat memasuki ekspansi lebih lanjut, ekspresi Cx43 mengalami peningkatan pada kultur jam ke-5 dan mulai menurun pada jam ke-15.

Pengaruh EGF terhadap ekspresi sel kumulus menunjukkan peningkatan ekspansi sel seiring dengan lamanya kultur tetapi tidak pada ekspresi Cx43, hal ini dimungkinkan karena pada perkembangan ekspansi sel kumulus lebih lanjut terjadi penyebaran sel sehingga menyebabkan penurunan komunikasi antar sel. Protein Cx43 adalah protein penyusun *gap junction* yang merupakan penghubung komunikasi satu sel dengan sel lainnya yang saling berdekatan, sehingga semakin ada jarak antar sel dan berkurangnya komunikasi antar sel.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa induksi EGF meningkatkan ekspansi sel kumulus seiring dengan peningkatan konsentrasi EGF dan waktu kultur. Induksi EGF meningkatkan ekspresi protein Cx43 pada kultur jam ke-5 dan mengalami penurunan pada jam ke-15. Penurunan ekspresi Cx43 terjadi karena berkurangnya komunikasi antar sel akibat penyebaran sel pada saat ekspansi sel kumulus.

### DAFTAR PUSTAKA

- BKKBN-NTB. 2009. Mengapa Belum Hamil Juga? <http://ntb.bkkbn.go.id/news>.
- Buccione, R., A.C. Schroeder, and J.J. Eppig. 1990. Interaction between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *J. Biol. Reprod.* 43:543-547.
- Cameron, S.J., S. Malik, M. Akaike, N. Lerner-Marmarosh, C. Yan, J.D. Lee, J. Abe, and J. Yang. 2003. Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *J. Biol. Chem.* 278(20):18682-18688.
- Cecconi, S., A. Mauro, G. Capacchietti, P. Berardinelli, N. Bernabò, A.R. Di Vincenza, M. Mattioli, and B. Barboni. 2008. Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocyte is induced by paracrine factor(s) released by gonadotropine-stimulated oocyte-cumulus cell complexes and involves mitogen activated protein kinase activation. *Endocrinology* 149:100-107.
- Gesbert, F. and J.D. Griffin. 2000. Bcr/Abl activates transcription of the *Bcl-X* gene through STAT5. *Blood* 96(6):2269-2276.
- Giepmans, B.N.G. 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular Research* 62:233-245.
- Gilchrist, R.B., M. Lane, and J.G. Thompson. 2008. Oocyte-secreted factors: regulation of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction* 14(2):159-177.
- Guo, Y., C. Martinez-Williams, and D.E. Rannels. 2003. Gap junction-microtubule association in rat alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285:1213-1221.
- Guren, T.K., J. Degard, H. Abrahamsen, G.H. Thoresen, M. Susa, Y. Andersson, E. Stby, and T. Christoffersen. 2003. EGF receptor-mediated, C-Src-dependent, activation of STAT5B is downregulated in mitogenically responsive hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 1(196):113-123.
- Henninghausen, L. and G.W. Robinson. 2008. Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes & Development* 22:711-721.
- Hooper, C. 2012. Epidermal growth factors and cancer : EGFR interactions, roles and cancer therapy options. [www.Abcam.Com/Index.Html?Pageconfig=Resource](http://www.Abcam.Com/Index.Html?Pageconfig=Resource).
- Kabotyanski, E.B., and J.M. Rosen. 2003. Signal transduction pathways regulated by prolactin and Src result in different conformations of activated STAT5B. *J. Biol. Chem.* 278(19):17218-17227.
- Kharchenko, M.V., A.A. Aksyonov, M.M. Melikova, and E.S. Kornilova. 2007. Epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis is accompanied by reorganization of microtubule system in hela cells. *Cell Biology International* 3(4):349-359.

- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C.W. Schindler. 2002. Signalling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene** 1(24):285.
- Lau, A.F., M.Y. Kanemitsu, W.E. Kurata, S. Danesh, and A.L. Boynton. 1992. Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation on connexin43 on serine. **Molecular Biology of Cell** 3:865-874.
- Luciano, A.M., S. Modina, R. Vassena, E. Milanesi, A. Lauria, and F. Gandolfi. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. **Biol. Reprod.** 70(2):465-472.
- Marchal, R., M. Caillaud, A. Martoriati, N. Gérard, P. Mermillod, and G. Gouder. 2003. Effect of growth hormone (GH) on in-vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthase, and connexin 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. **Biol. Reprod.** 69:1013-1022.
- Mori, T., T. Amano, and H. Shimizu. 2000. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in-vitro. **Biol. Reprod.** 62:913-919.
- Paukku, K. 2003. Regulation of STAT5 Activation. **Dissertation**. Department of Virology Haartman Institute and Division of Biochemistry Department of Biosciences University of Helsinki. Helsinki.
- Sutovsky, P., J.E. Flechon, B. Flechon, J. Motlik, N. Peynot, P. Chesn, and Y. Heyman. 1993. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in-vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biol. Reprod.** 49:1277-1287.
- Sutton, C.D., L.J. Marshall, N. Williams, D.P. Berry, W.M. Thomas, and M.J. Kelly. 2003. Colo-rectal anastomotic leakage often masquerades as a cardiac complication. **Colorectal Disease** 6(1):21-22.
- Suzuki, H., B.S. Jeong, and X. Yang. 2000. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. **Biol. Reprod.** 63:723-729.
- TenBroek, E.M., P.D. Lampe, J.L. Solan, J.K. Reynhout, and R.G. Johnson. 2001. Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. **The Journal of Cell Biology** 155(7):1307-1318.
- Webb, R.J., H. Bains, C. Cruttwell, and J. Carroll. 2002. Gap-junction communication in mouse cumulus-oocyte complexes: Implication for the mechanism of meiotic maturation. **Reproduction** 123:43-52.
- Widjati. 2007. Induksi Maturasi Oosit Secara In Vitro oleh Transforming Growth Factor  $\beta$  Asal Oosit Kumulus Komplek. **Disertasi**. Universitas Brawijaya. Malang.
- Yang, Z., R. Bagheri-Yarmand, R-A. Wang, L. Adam, V.V. Papadimitrakopoulou, G. L. Clayman, A. El-Naggar, R. Lotan, C.J. Barnes, W.K. Hong, and R. Kumar. 2004. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) suppresses c-Src and Pak1 pathways and invasiveness of human cancer cells. **Clinical Cancer Research** (10):658-667.